

THESIS

MUNICH

1966

**Untersuchungen zur Bestimmung
der Sekretionsraten von
Corticosteron**

Werner Fischer

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154016_0159

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. H. Schwiegk

U N T E R S U C H U N G E N Z U R B E S T I M M U N G
D E R S E K R E T I O N S R A T E V O N
C O R T I C O S T E R O N

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin, verfaßt
und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwigs-Maximilians-
Universität zu München

vorgelegt von

W e r n e r F i s c h e r

aus

Kaufbeuren

München 1966

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Doz. Dr. med. J. Karl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Schwiegk

Dekan: Prof. Dr. M. Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 8. November 1966

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

LITERARISCHER TEIL

Corticosteronsekretion bei Tieren

Die biologische Wirkung von Corticosteron

EXPERIMENTELLER TEIL

A) Die Methode zur Bestimmung der Corticosteronsekretionsrate

B) Untersuchungen und Diskussion zur Methode

I. Allgemeine Vorbemerkungen

II. Voraussetzungen für die Bestimmung der Corticosteronsekretionsrate

III. Besprechung und experimentelle Prüfung der methodischen Einzelschritte

1. Fermenthydrolyse

2. Extraktion

3. Chromatographie

4. Farbreaktion

5. Messung der Radioaktivität von Tetrahydrocorticosteron

C) Ergebnisse von Bestimmungen der Sekretionsrate von Corticosteron bei Normalpersonen

ZUSAMMENFASSUNG

LITERATUR

EINLEITUNG

Aus Nebennierenrindenextrakten wurden bisher 45 verschiedene Steroidhormone isoliert (1). Nur ein Teil dieser Steroide wird von der Nebennierenrinde sezerniert und kann im Nebennierenvenenblut nachgewiesen werden (2). Bei den übrigen handelt es sich um Zwischenstufen der Steroidbiosynthese. Von den sezernierten Steroidhormonen werden Cortisol, 11-Hydroxy- Δ^4 -cholestan-3-one, Aldosteron und Corticosteron als die wichtigsten angesehen. Cortisol hat vorwiegend glucocorticoide, Aldosteron fast ausschließlich mineralocorticoide und 11-Hydroxy- Δ^4 -cholestan-3-one anabole und androgene Eigenschaften. Corticosteron nimmt unter den Nebennierenrindensteroiden eine Sonderstellung ein, da es gleichermaßen den Mineralhaushalt und den Glucosestoffwechsel beeinflusst.

Täglich werden etwa 25 mg Cortisol, 0,2 mg Aldosteron und offenbar 3 mg Corticosteron produziert (3). Die tägliche Corticosteron-Sekretion entspricht somit etwa $\frac{1}{8}$ der Cortisolsekretion und dem 15-fachen der Aldosteronsekretion.

KENDALL und REICHSTEIN (4) haben für Corticosteron folgende Strukturformel angegeben:

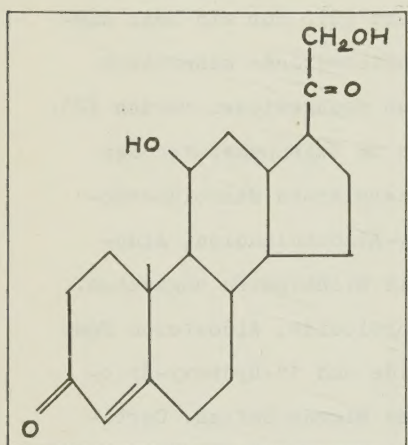
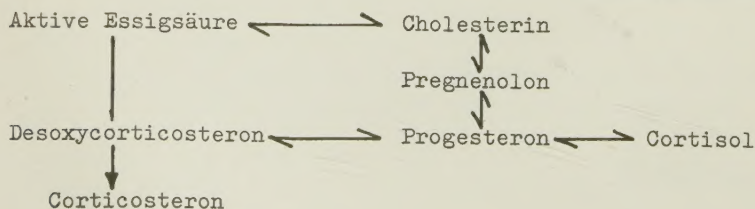


Abbildung 1:
Strukturformel von Corticosteron

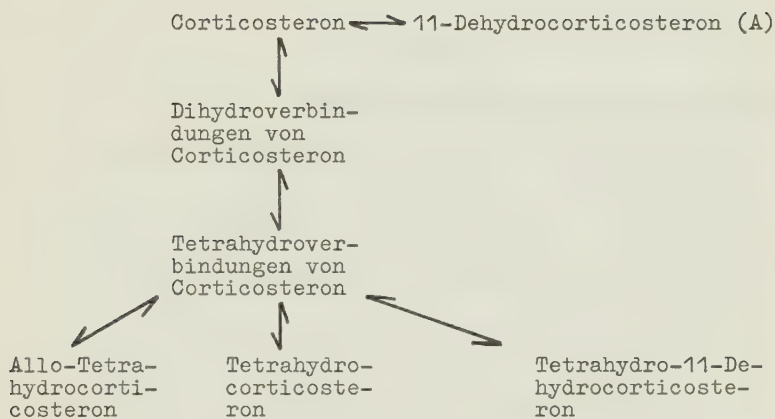
Voraussetzung für die Bestimmung der Sekretionsrate von Corticosteron ist die Kenntnis der Biosynthese und des Abbaus dieses Steroids.

In den beiden stark vereinfachten Schemata sind die wesentlichen Schritte der Biosynthese und des Abbaus von Corticosteron in seine Hauptmetaboliten dargestellt (5):

Biosynthese



Abbau



LITERARISCHER TEIL

Die Corticosteronsekretion bei Tieren

BUSH (6) konnte als erster nachweisen, daß die Rattennebennierenrinde als Hauptglucocorticoid Corticosteron sezerniert. SINGER und STACK (7) gaben als Durchschnittsleistung der Rattennebennierenrinde 75 μg Corticosteron pro Drüse/kg-Körpergewicht/Std. und 0,33 μg Aldosteron pro Drüse/kg-Körpergewicht/Std. an. Cortisol wird nach diesen Untersuchungen von der Ratte nicht sezerniert. Bei Mäusen, Kaninchen und manchen Vögeln konnte als Hauptglucocorticoid ebenfalls Corticosteron isoliert werden (8). Im Nebennierenvenenblut von Hunden fanden FARELL und Mitarbeiter (9) 20 μg Cortisol, 6 μg Corticosteron und 0,25 μg Aldosteron pro Drüse/kg-Körpergewicht/Std.

Die biologische Wirkung von Corticosteron

Die Ratte wurde zur Erforschung der physiologischen Wirkung von Corticosteron am häufigsten als Versuchstier benutzt. BRITTON und SILVETTE (10) demonstrierten, daß bei diesen Tieren nach Adrenalektomie das Leberglykogen, Muskelglykogen und der Blutzuckerspiegel absinken. KUIZINGA (11) fand entsprechend nach Gabe von Corticosteron einen deutlichen Anstieg des Blutzuckers und

eine Zunahme des Leber- und Muskelglykogens. Obwohl Corticosteron als Glucocorticoid bei der Ratte dominiert, kann man bei adrenaletomierten Ratten mit Cortisol eine viel stärkere Beeinflussung des Kohlehydratstoffwechsels erzielen als mit Corticosteron (11). Bei der Regulation des Mineralhaushalts der Ratte hat Aldosteron größere Bedeutung als Corticosteron. In einer von F. GROSS (12) zusammengestellten Tabelle werden einige der wichtigsten biologisch wirksamen Steroidhormone, deren Mineralocorticoidwirkung bei der adrenaletomierten Ratte untersucht wurde, aufgeführt.

T a b e l l e

	adrenaletomierte Ratten		
	Na ²⁴ / _K 41	Na ⁺ -Retention	K ⁺ -Excretion
DOC	100	100	100
B	14	0,5	15
A	7	10,3	10
F	8	0,03	10
Aldosteron	10.000	2.500	500

Abbildung 2: Pharmakologischer Vergleich der Mineralocorticoidwirkung von DOC, B, A, F und Aldosteron. (DOC wurde die Zahl 100 gegeben und alle anderen Steroide zu der Aktivität von DOC in Beziehung gesetzt)

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, beeinflußt Corticosteron den Natrium- und Kaliumstoffwechsel stärker als Cortisol. Aldosteron übertrifft allerdings in seiner Wirksamkeit pro Gewichtseinheit Corticosteron um ein Vielfaches.

Beim Menschen konnte die Wirkung von Corticosteron erstmals untersucht werden, nachdem Patienten mit Nebenniereninsuffizienz mit diesem Hormon substituiert wurden. THORN und Mitarbeiter (13) verabreichten einem Patienten mit M. Addison 85 mg Corticosteron i.m., das KENDALL aus Nebennierenextrakten isoliert hatte. Dabei wurde ein Anstieg des Nüchternblutzuckers, ein Abfall des respiratorischen Quotienten und eine Stabilisierung des Blutzuckerspiegels beobachtet. CONN und Mitarbeiter (14) konnten durch Gabe von 25 mg Corticosteron eine Verminderung der Natriumausscheidung und eine Erhöhung der Kaliumausscheidung im Urin nachweisen. Durch weitere Untersuchungen zeigten THORN und Mitarbeiter (15), daß Corticosteron auf den Elektrolythaushalt stärker wirkt als Cortison und Cortisol. Schließlich konnte mit Corticosteron das charakteristisch niedrige EEG (Slow EEG), das bei unbehandelten oder DOC-behandelten Addisonkranken regelmäßig beobachtet wird, normalisiert werden. Subjektiv fühlten sich die Addison-Patienten unter der täglichen Verabreichung von 50 - 100 mg Corticosteron gut.

Der Versuch, Addison-Kranke mit Corticosteron allein zu substituieren, scheiterte jedoch, da die Corticosterondosis, die eine optimale Glucocorticoidwirkung gewährleistete, zu einer erheblichen Na-Retention führte. Wurde umgekehrt die Corticosteron-Dosis so gewählt, daß der Elektrolythaushalt gut eingestellt war, zeigte sich eine vermehrte Neigung zur Hypoglykämie. Um bei Normalpersonen eine humoral faßbare Wirkung von Corticosteron zu erzielen, muß dieses Hormon höher dosiert werden als bei Addison-Kranken. Die Beeinflussung des Glukosestoffwechsels ist dabei gering (15). THORN (15) konnte jedoch durch folgende Versuchsanordnung den Einfluß von Corticosteron auf den Elektrolytstoffwechsel nachweisen: Er bestimmte bei einer Normalperson stündlich Kalium, Natrium und Chlorid im Urin. In der ersten Stunde des Versuches wird dem Probanden nichts zugeführt. Von der 2. mit 4. Stunde erhielt die Versuchsperson 60 ml physiologische Kochsalzlösung pro Stunde i. v. Ab der 5. Stunde wurden zusätzlich 12 mg Corticosteron pro Stunde in Form einer alkoholischen Lösung infundiert.

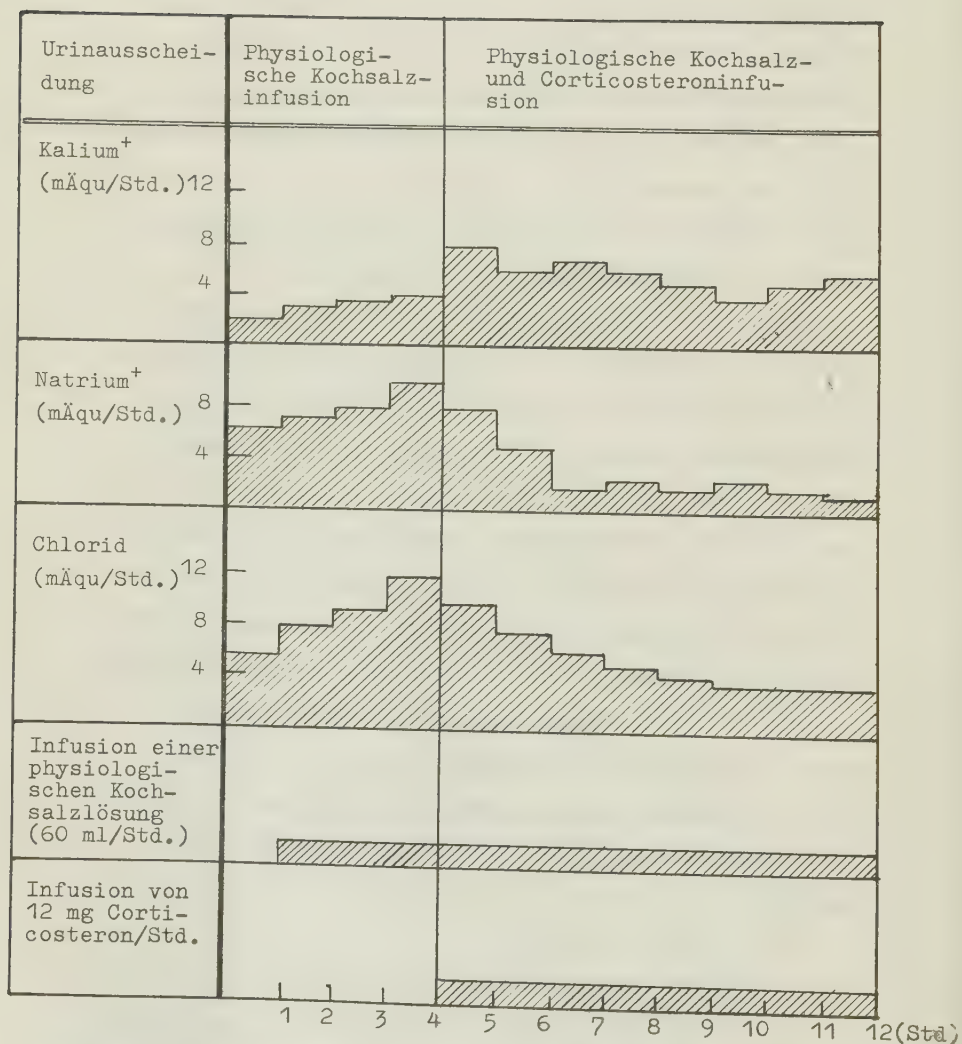


Abbildung 3: Ausscheidung von Kalium, Natrium und Chlorid im Urin während einer Infusion von 12 mg Corticosteron pro Stunde bei einer Normalperson (THORN 1953)

Wie aus der graphischen Darstellung zu ersehen ist, nimmt ein bis zwei Stunden nach Beginn der Infusion von physiologischer NaCl-Lösung die Kalium-, Natrium- und Chloridausscheidung im Urin zu. Einige Stunden nach Gabe von Corticosteron vermindert sich die Natrium- und Chloridausscheidung im Urin deutlich und die Kaliumausscheidung im Urin nimmt zu. Diese Beobachtungen stimmen grundsätzlich mit den Ergebnissen ähnlicher Untersuchungen bei Addison-Kranken überein (16).

Welche Bedeutung Corticosteron neben dem Mineralo-Corticoid Aldosteron und dem Glucocorticoid Cortisol beim Menschen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zukommt, konnte durch die bisherigen Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

A) Die Methode zur Bestimmung der Corticosteronsekretionsrate (17)

1. Reinsubstanzen und Reagentien

4-¹⁴C-Corticosteron = 4-¹⁴C-11 β , 21-dihydroxy- Δ^4 -pregnen-3,20-dion; spezifische Aktivität 46 mC/mmol (New England Nuclear Corporation, Bethesda).

Tetrahydrocorticosteron (THB) = 3 α ,11 β ,21-trihydroxypregnan-20-on (Steroid Reference Collection, London).

Cortison = 17 α ,21-dihydroxy- Δ^4 -pregnen-3,11,20-trion (Schering, Berlin).

11-Desoxycortisol (Reichsteins Substanz S) = 17 α ,21-dihydroxy- Δ^4 -pregnen-3,20-dion (Schering, Berlin).

β -Glucuronidase, 375 Fishman Einheiten/mg (Schering, Berlin).

Tetrazoliumblau (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, USA).

Silicagel, grade 923, mesh size 100 - 200 (W. R. Grace Davison Chemical Division, USA).

FPO (2,5-Diphenyloxazol) und POPOP (1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)benzol) (Packard Instrument Company, Illinois, USA).

Die übrigen Reagentien wurden von der Fa. E. Merck, Darmstadt, bezogen (p.a. oder zur Chromatographie).

2. Verabreichung von 4-¹⁴C-Corticosteron

0,2 µc = 1,5 µg 4-¹⁴C-Corticosteron, gelöst in 1 ml Alkohol und verdünnt mit 20 ml physiologischer Kochsalzlösung wird der Versuchsperson innerhalb von 5 Minuten i. v. injiziert. Vor der Injektion wird die Blase entleert und anschließend der Urin zweimal 24 Stunden gesammelt.

3. Messung der Gesamtaktivität im Urin

Im Urin wird die Gesamtaktivität der ersten und zweiten 24-Stunden-Urinmenge nach den Angaben von FLOOD (18) bestimmt. 1/50 der Urinmenge wird mit H₂O auf 50 ml aufgefüllt. Für die Messung der Radioaktivität wird folgender Ansatz verwendet: 0,6 ml verdünnter Urin, 6 ml Äthanol abs. und 10 ml Szintillator-Flüssigkeit (4 g PPO, 0,1 g POPOP in 1.000 ml Toluol). Diese Menge wird in ein Meßgläschen gegeben und die Radioaktivität im Liquidszintillationsspektrometer (Packard Tri-Carb Modell 3002 3 x 40 Min.) gemessen. Nach Korrektur des "quenching" mit einem internen Standard und nach Abzug des Leerwertes wird die Aktivität (Imp./min) der Urintagesmenge berechnet.

4. Isolierung des Corticosteron-Metaboliten Tetrahydrocorticosteron

a) Vorbehandlung des Urins

Der zehnte Teil der 24-Stunden-Urinmenge (0 - 24 Stunden nach i. v.-Injektion von 4-¹⁴C-Corticosteron) wird filtriert und mit 1/10 Volumen Na-Acetat (0,2 M) und 1/10 Volu-

men Essigsäure (0,2 M) auf einen pH-Wert von 4,6 bei Zimmertemperatur eingestellt. Werden in der zweiten Urin-Tagesmenge (24 - 48 Stunden p. i.) mehr als 5 % der verabreichten radioaktiven Dosis gefunden, dann erfolgt die Isolierung von Tetrahydrocorticosteron aus 1/10 Volumen der 48-Stunden-Urinmenge. Um die Glucuronsäureester zu spalten, gibt man 1 ml Urin 300 F. E. (= FISHMAN-Einheiten) β -Glucuronidase (Schering) zu. Zur Esterspaltung wird der Urin 24 Stunden bei 47°C bebrütet.

b) Extraktion

Nach der Bebrütung wird der Urin in einen Schütteltrichter gegossen und mit dem gleichen Volumen (V : V) Dichlormethan 10 Minuten geschüttelt. Nach Trennung der Phasen wird das spezifisch schwerere Dichlormethan in ein Sammelgefäß abgelassen und der zurückbleibende Urin analog ein 2. und 3. mal extrahiert.

c) Reinigung des Extraktes mit Natronlauge und Wasser

Den aus drei Extraktionsgängen anfallenden Extrakt gießt man in einen Schütteltrichter und schüttelt je zweimal mit 1/10 Volumen n/10 NaOH und 1/10 Volumen H₂O eine halbe Minute lang.

d) Trocknen des Extraktes

Der Extrakt wird mit 6 g Natrium-sulfuricum-anhydricum pro 100 ml Lösungsmittel getrocknet und das Dichlormethan anschließend bei 40°C im Vakuumrotationsverdampfer abdestilliert.

e) Petrolätherverteilung nach PETERSON (19)

Den Extrakt löst man in 10 ml absolutem Alkohol und verdünnt die alkoholische Lösung dann mit 30 ml aqua dest. Der so gelöste Extrakt wird dann mit 100 ml Petroläther p.a. vorsichtig geschüttelt. Nach Dekantieren des Petroläthers werden die Steroide aus der alkoholischen Lösung dreimal mit je 40 ml Dichlormethan extrahiert. Die Dichlormethan-Extrakte werden in einem Rundkolben gesammelt und im Rotationsverdampfer bei 40°C abgedampft.

f) Vorchromatographie im System BUSH B/50

Das Chromatographiesystem BUSH B/50 besteht aus Benzol, Methanol und Wasser. (Mischungsverhältnis 2 : 1 : 1). Chromatographiert wird auf WATHMANN-Papier Nr. 1. Die Abmessung des Papierstreifens beträgt: Breite 8 cm, Länge von der Startlinie bis zum Streifenende 40 cm. Der Extrakt wird auf die Startlinie aufgetragen und nach einer Equilibrierdauer von 1 Stunde bei 23°C absteigend chromatographiert. Nach einer Laufzeit von etwa 4 Stunden hat die Lösungsmittelfront das untere Ende des Chromatogramms erreicht. Als Leitsubstanz dienen auf Parallelstreifen Cortison (E) und 11-Desoxycortisol (S). Mit Hilfe der Leitsubstanzen kann man den Bereich der höher polaren Steroide, vorwiegend Cortisolmetaboliten, von dem der weniger polaren Corticosteronmetaboliten abgrenzen. Das Chromatogramm mit den beiden Leitsubstanzen wird mit einer Tetrazolblaulösung

(1 Teil 1-%-ige Tetrazolblaulösung, 9 Teile 2 n NaOH) angefärbt. Der Chromatogrammstreifen mit dem Extrakt wird oberhalb der Zone E und unterhalb der Zone S entsprechend dem gefärbten Parallelstreifen ausgeschnitten und mit dreimal 50 ml Methanol je eine Stunde im Brutschrank bei 40°C eluiert. Das Eluat wird filtriert und das Lösungsmittel im Rotationsvakuumverdampfer abgedampft.

g) Hauptchromatogramm im System BUSH LT 21/85

Das Chromatographiesystem LT 21/85 besteht aus Petroläther : Toluol : Methanol : Wasser im Verhältnis 67 : 33 : 85 : 15. Auch in diesem System dient als Chromatographiepapier WATHMANN Nr. 1. Die Abmessung der Papierstreifen ist: Breite 4 cm, Länge von der Startlinie bis zum Streifenende 40 cm. Das Gesamteluat wird vor dem Auftragen in zwei gleiche Teile geteilt und je eine Hälfte auf Parallelstreifen in der beim Vorchromatogramm beschriebenen Weise aufgetragen. Als Leitsubstanz dient die auf zwei zusätzlichen Parallelstreifen aufgetragene Reinsubstanz Tetrahydrocorticosteron. Nach einer Equilibrierzeit von einer Stunde wird absteigend 28 Stunden bei 23°C chromatographiert. Ein Streifen mit der Hälfte des Extraktes und die Streifen mit der Tetrahydrocorticosteron-Reinsubstanz werden mit Tetrazolblaureagens (1 Teil wäßrige Tetrazolblaulösung, 9 Teile 2 n NaOH) angefärbt und die Tetrahydrocorticosteron entsprechende Zone auf dem Chromatogramm mit der zweiten Hälfte des Extraktes mit 3 x 5 ml Methanol p. a. eluiert. Das Eluat wird bei 40°C abgedampft.

h) Reinigen des Eluats an einer Silicagelsäule

Eine aus 2 g Silicagel bereitete, etwa 10 cm hohe Säule wird mit 15 ml Methanol-Chloroform (Mischungsverhältnis 1 : 1) vorgewaschen. Danach löst man das Eluat der THB-Zone in 3 ml Methanol-Chloroform und überträgt es quantitativ auf die Säule. Anschließend kann THB mit 25 ml Methanol-Chloroform aus der Säule eluiert werden. Das Eluat wird in einem Erlenmeyerkölbchen aufgefangen, bei 40°C abgedampft und der Trockenrückstand in 3 ml absol. Äthylalkohol gelöst. 1 ml wird für die Radioaktivitätsmessung, 2 ml werden zur quantitativen Bestimmung von THB verwendet.

5. Quantitative Bestimmung von Tetrahydrocorticosteron

Für die Tetrazolblaureaktion werden folgende Reagentien bereitgestellt: 15 mg Tetrazolblau werden in 3 ml abs. Äthanol gelöst; nach 5 Minuten bei 25°C wird der Überstand in ein Spitzglas dekantiert. Gleichzeitig wird eine alkoholische Tetramethylammoniumhydroxydlösung frisch bereitet. (0,5 ml 10%-iges Tetramethylammoniumhydroxyd in 4,5 ml abs. Äthanol).

Zu dem in 2 ml abs. Alkohol gelösten Teil des Extraktes werden aus der alkoholischen Tetrazolblau- und Tetramethylammoniumhydroxydlösung je 0,2 ml gegeben. Nach 25 Minuten bei 25°C im Thermostaten wird die Reaktion mit 0,01 ml = 1 Tropfen Eisessig unterbrochen und die Extinktion der Proben im Spektralphotometer (BECKMAN DU) bei einer Wellenlänge von 510 μ m und einer Schicht-

dicke von 10 mm gegen den Leerwert der Reagenzien gemessen. Nach Abzug des Papierleerwertes wird die THB-Menge an einer Eichkurve, aufgestellt mit 0,5 µg - 20 µg THB-Reinsubstanz, abgelesen und auf die 24-Stunden-Urinmenge umgerechnet. Bei jedem Ansatz wird eine Probe aus 10 µg THB-Reinsubstanz zur Kontrolle der Eichkurve mitbestimmt.

6. Bestimmung der Radioaktivität von THB

Der Rest des Eluats wird in ein Meßgläschen übertragen, abgedampft und der Trockenrückstand in 1 ml abs. Äthanol gelöst. Nach Zugabe von 10 ml Szintillatorflüssigkeit wird 30 Minuten im PACKARD Tri-Carb 3002 mit der Einstellung der Diskriminatoren 50 - 500 gain 9,0 gezählt.

7. Berechnung der Corticosteronsekretionsrate (SRB)

Die Corticosteronsekretionsrate wird nach folgender Formel berechnet:

$$SRB = \frac{I_i}{I_x} \cdot \frac{X}{t} \text{ (mg/Tag)}$$

I_i = Radioaktivität (Imp./Min.) des injizierten ^{14}C -Corticosterons

I_x = Radioaktivität (Imp./Min.) des im Urin ausgeschiedenen Corticosteronmetaboliten Tetrahydrocorticosterons

X = Menge des im 24-Stunden-Urin ausgeschiedenen Corticosteronmetaboliten Tetrahydrocorticosterons (mg/Tag)

t = Urinsammeldauer (Tage)

An einem Beispiel soll der Gang der Berechnung der Sekretionsrate dargestellt werden. Es wurden die Ergebnisse eines unserer Versuche verwendet.

Meßergebnisse: (Versuch Pat. S. C.)

- 1) I_i = 185.000 Imp./Min.
- 2) I_x = 10.013 Imp./Min.
- 3) X = 0,168 mg/Tag
- 4) t = 1 Tag

In die Formel eingesetzt ergibt sich:

$$\begin{aligned} \text{SRB} &= \frac{185.000 \times 0,168}{10.013 \times 1} \quad (\text{mg/Tag}) \\ &= 3,1 \quad (\text{mg/Tag}) \end{aligned}$$

Hydrolyse

β -Glucuronidase
 300 FE/ml Urin
 pH 4.6 24 Std 46°C

Extraktion

3 x mit CH_2Cl_2
(V:V)

Reinigung des Extrakts

Waschen:
 $2 \times 1/10$ Vol $\frac{n}{10}$ NaOH
 $2 \times 1/10$ Vol H_2O

Verteilung

Petroläther: $\text{H}_2\text{O} / \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
(100:30/10)

Rückextraktion

3x2 Vol CH_2Cl_2

Papierchromatographie

I. System Bush B5
4 Std 23°C

II. System LT 21/85
28 Std 23°C

Elution 1

3x50ml CH₃OH 40°C

Elution I

3 x 5 ml CH_3OH 40°C
Abdampfen bei 40°C

Säulenchromatographie

2g Silicagel
Elution: 20ml CH₃OH : CHCl₃
(V:V)

Abdampfen 40°C
Lösen in 3ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

Messung

Colorimetrische Bestimmung BT-Reaktion

Methodisches Schema zur Be-
stimmung der Sekretionsrate
von Corticosteron

C¹⁴-Messung
Szintillationszähler

B) Untersuchungen und Diskussion zur Methode

I. Allgemeine Vorbemerkungen

Durch Anwendung neuer Methoden, wie zum Beispiel der Säulen- und Papierchromatographie, wurde es möglich, den Corticosteron-Plasmaspiegel (20) und die Ausscheidung von Corticosteron und seinen Metaboliten im Urin zu bestimmen (21, 22, 23). Ein Nachteil dieser Methoden ist, daß zum Beispiel aus dem Corticosteron-Plasmaspiegel keine Rückschlüsse auf die von der Nebennierenrinde pro Zeiteinheit sezernierte Corticosteronmenge möglich sind, da das Verteilungsvolumen, die Abbaugeschwindigkeit und die Nierenfunktion die Plasmakonzentration von Corticosteron beeinflussen. Außerdem unterliegt die Nebennierenrindensekretion tageszeitlichen Schwankungen. Die Bestimmung der Nebennierenrindensteroiden im Nebennierenvenenblut (2, 24) ist nur unter den Bedingungen einer Stress-Situation möglich. Rückschlüsse auf Sekretion unter Ruhebedingungen sind deshalb nur mit großen Vorbehalten möglich.

Erst mit der Isotopen-Verdünnungsmethode wurde es möglich, die Sekretionsrate von Steroiden zu bestimmen (26).

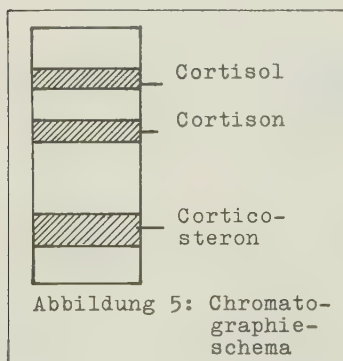
II. Voraussetzungen für die Bestimmung der Corticosteronsekretionsrate

Bei der Bestimmung der Sekretionsrate von Corticosteron wird von folgenden Voraussetzungen ausgegangen:

1. Das radioaktivmarkierte Corticosteron muß rein sein und wie endogenes Corticosteron metabolisiert werden.

Geprüft wurde die R e i n h e i t des von uns verwendeten ^{14}C -Corticosteron durch folgende Versuchsanordnung:

^{14}C -Corticosteron wurde auf Chromatographiestreifen aufgetragen und absteigend im System BUSH B/50 chromatographiert (Doppelversuch).



Von 100 % aufgetragener Substanz wurde gefunden:

In der Zone von
Corticosteron 95,3 %,
Cortisol 1,64%,
Cortison 0,70%.

Das Ergebnis des Versuchs zeigt, daß das verabreichte Corticosteron zu mindest 95 %-ig rein ist.

2. Der Corticosteronabbau befindet sich im "steady state". Nur unter diesen Bedingungen besteht zwischen den von der Nebennierenrinde sezernierten Corticosteron und seinem Urinmetaboliten Tetrahydrocorticosteron ein Proportionalitätsverhältnis. Durch eine intravenöse Verabreichung von Corticosteron könnte dieser Gleichgewichtszustand gestört werden. Bei unseren Versuchen beträgt aber die injizierte Corticosteronmenge nur ungefähr 0,75 % der in 24 Stunden sezernierten Corticosterongesamtmenge, entsprechend etwa 0,5 % des Corticosteronpools (19). Es ist deshalb nicht anzunehmen, daß bei der Bestimmung der Corticosteronsekretionsrate durch das injizierte Steroid der physiologische Abbau des Hormons gestört wird.
3. Tetrahydrocorticosteron, aus dessen spezifischer Aktivität die Sekretionsrate von Corticosteron bestimmt wird, muß ausschließlich ein Metabolit von Corticosteron sein (19, 22, 23).
4. Der isolierte Corticosteronmetabolit Tetrahydrocorticosteron muß chemisch rein sein. J.H. KARL und L. RAITH (27) fanden beim Vergleich der Spektalkurven des aus Urin isolierten Tetrahydrocorticosteron und von reinem Tetrahydrocorticosteron

gleiche Extinktionsmaxima im Bereich von $430\text{ }\mu\text{m}$ - $440\text{ }\mu\text{m}$ und $320\text{ }\mu\text{m}$ (Methode nach AXELROD mit konzentrierter H_2SO_4) (28).

Nach einer einmaligen Injektion von radioaktivem Corticosteron sinkt der Plasmaspiegel des Steroids vom Zeitpunkt der vollständigen Durchmischung mit dem endogenen Corticosteron stetig ab; der Plasmaspiegel des endogenen Hormons bleibt dagegen konstant, da laufend von der Nebennierenrinde Corticosteron sezerniert wird.

Für den Abbau von Corticosteron ist die Verteilung des Steroids in die einzelnen Körperräume ebenfalls von Bedeutung. TAIT (29) nimmt für Corticosteron ein kleines Verteilungsvolumen an, da es bekanntlich im Vergleich zu Aldosteron und Progesteron relativ stark an Plasmaproteine gebunden ist. Nach seiner Ansicht ist es nicht notwendig, den Verteilungsraum von Corticosteron in mehrere Einzelräume zu unterteilen. Das endogene Corticosteron ist in diesem einen Raum in einer annähernd konstanten Konzentration gelöst; die Konzentration des parenteral verabreichten ^{14}C -Corticosterons, das sich genau so verhält, wie das endogene Hormon, nimmt jedoch ab. Im Zeitintervall $4t$ fällt bei $4t \rightarrow 0$ die Radioaktivität im Blutplasma nach der Formel

$$dR = M C R \times X \times dt$$

ab (29).

R = injizierte Gesamtradioaktivität

M C R = Metabolic Clearance Rate = das Volumen Plasma, das in einem bestimmten Zeitintervall vollständig von ^{14}C -Corticosteron befreit wird

X = Radioaktivität im Plasma

t = Zeit

Die während der Zeit Δt ausgeschiedene Radioaktivität wäre dann gleich dem Integral von

$$M C R \times X \times dt$$

Nach PETERSON kann man den Abfall der Konzentration des injizierten Corticosterons auch durch folgende einfache Exponentialfunktion ausreichend genau beschreiben (26):

$$X = D'e^{-\theta t}$$

X = Radioaktivität im Plasma

t = Zeit

D' = Konstante

θ = Konstante (gibt die Steilheit des Kurvenabfalls an)

Die dazu gehörige Kurve sieht dann folgendermaßen aus:



Diese zum großen Teil noch nicht experimentell belegten Zusammenhänge sind für die Bestimmung der Corticosteronsekretionsrate mit der beschriebenen Gleichung von großer Bedeutung; denn müßte diese Gleichung mehrere Variable enthalten, würde sich das injizierte ^{14}C -Corticosteron in mehrere Compartments verteilen (30).

III. Besprechung und experimentelle Prüfung der methodischen Einzelschritte

1. Fermenthydrolyse

Die Fermenthydrolyse mit β -Glucuronidase erfaßt nur die als Glucuronsäureester ausgeschiedenen Corticosteronmetaboliten (31). Es sind dies im Durchschnitt bei unseren Versuchen 28 % (von 15 % - 48 %) des injizierten ^{14}C -Corticosterons. Ohne Hydrolyse konnten im Mittel 0,5 %, nach Solvolyse (32), einem Verfahren mit dem die Schwefelsäureester der Steroide hydrolisiert werden, im Durchschnitt 1,3 %, nach heißer Hydrolyse bei pH 1 15 % des injizierten radioaktiven Corticosterons aus dem Urin extrahiert werden.

Zur Hydrolyse mit β -Glucuronidase haben wir folgende Untersuchungen durchgeführt:

- a) Einfluß von Temperatur und Bebrütungszeit auf die Spaltung von Glucuronsäureester mit Glucuronidase,

- b) Einfluß eines Penicillinzusatzes zum Urin und damit Hemmung des Bakterienwachstums während der Bebrütung auf die Spaltung von Glucuronidase

Versuchsanordnung:

Ein zur Bestimmung der Corticosteronsrate vorgesehener Urin wurde auf pH 4,6 eingestellt und 30 Proben zu je 2,0 ml mit 500 F.E. Glucuronidase/ml Urin versetzt.

1. Serie:

Bebrütungsdauer 12 Stunden

bei 37°C: 2 Proben ohne Penicillin

2 Proben mit Penicillin

1 Probe ohne β -Glucuronidase (Leerwert)

2. Serie:

Bebrütungsdauer 24 Stunden

bei 37°C: 2 Proben ohne Penicillin

2 Proben mit Penicillin

1 Probe ohne β -Glucuronidase (Leerwert)

3. Serie:

Bebrütungsdauer 48 Stunden

bei 37°C: 2 Proben ohne Penicillin

2 Proben mit Penicillin

1 Probe ohne β -Glucuronidase (Leerwert)

Außerdem wurden noch 3 weitere Serien mit analoger Aufteilung der Proben bei einer Temperatur von 47°C bebrütet. Nach der Bebrütung wurden die Proben eine Minute lang mit je 14 ml Dichlormethan geschüttelt, die Extrakte dekantiert, quantitativ in ein Meßgläschen übertragen, abgedampft, mit 1 ml Äthanol und 10 ml Szintillatorflüssigkeit versetzt und 20 Minuten gezählt. Von den Meßergebnissen der Doppelversuche wurde das arithmetische Mittel gebildet und der Leerwert abgezogen.

Graphische Darstellung der Ergebnisse

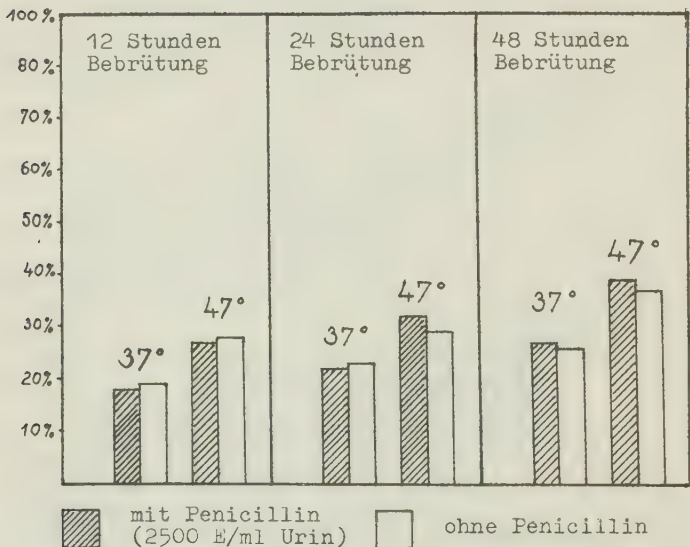


Abbildung 6: Wirkung der β -Glucuronidase (500 E/ml Urin) bei verschiedenen Bebrütungszeiten, Temperaturen und Penicillinzusatz
100 % = 180.000 Impulse/Min. (= injizierte $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Corticosterondosis)

Die Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne Penicillin sind so gering, daß sie innerhalb der Schwankungsbreite der Methode liegen. Die Ausbeute ist bei 47°C durchwegs größer als bei 37°C. Bei einer Bebrütungstemperatur von 47°C über 48 Stunden sind um 8 % mehr Corticosteronmetaboliten extrahierbar als bei 24 Stunden. Da wir bei unseren Untersuchungen nicht von der absoluten Menge der ausgeschiedenen Corticosteronmetaboliten abhängig sind, wählten wir aus praktischen Gründen eine Bebrütungszeit von 24 Stunden.

2. Extraktion, Reinigung des Extraktes und Petrolätherverteilung

- a) Der Verlust, der bei der Extraktion des Urins mit Dichlormethan und dessen Vorreinigung mit 1/10 n NaOH auftritt, wurde gemessen.

Versuchsanordnung:

Einem zehntel Volumen eines 24-Stunden-Urins wurde ^{14}C -Corticosteron zugesetzt und anschließend wie beschrieben extrahiert. Nach Reinigung des Extraktes wurde das Lösungsmittel abgedampft, der Extrakt in ein Meßgläschen übertragen und im Szintillationszähler gezählt.

Ergebnis: Der durch die Extraktion und das Waschen bedingte Verlust beträgt 5 %.

b) Messung des Verlustes bei der Petrolätherverteilung

Von 4 verschiedenen Urinen wurden je 50 ml entnommen und jeder Probe ^{14}C -Corticosteron zugesetzt. Nach dreimaliger Extraktion mit je 50 ml Dichlormethan bestimmte man die Radioaktivität dieser Rohextrakte. Anschließend erfolgte die Petrolätherverteilung und die Rückextraktion der Steroide aus der wäßrigen Phase. Nach Abtrennung der Petrolätherphase wurde in beiden Phasen die Radioaktivität gemessen.

Ergebnis: Setzt man die Impulszahl des Extraktes vor der Petrolätherverteilung = 100 %, so enthielt die Petrolätherphase im Mittel 3,6 %, die wäßrige Phase 0,36 %. Der Gesamtverlust betrug etwa 4 %.

3. Chromatographie

a) Vorchromatogramm

Das Vorchromatogramm (System BUSH B/5) dient dazu, die hochpolaren Cortisolmetaboliten von den niedropolaren Corticosteronmetaboliten

zu trennen. Der Verlust, der dabei auftritt, wurde bestimmt.

Versuchsanordnung:

Zur Messung des Verlustes diente ^{14}C -Corticosteronstammlösung, die $10\text{ }\mu\text{g}$ ^{14}C -Corticosteron pro ml enthielt. 0,1 ml dieser Lösung wurden auf zwei Chromatographiestreifen aufgetragen und im System BUSH B/5 absteigend chromatographiert. Die Corticosteronzone wurde durch Radiopapierchromatographie ermittelt, mit Methanol p. a. eluiert und die Impulse des Eluats im Szintillationszähler gezählt.

Ergebnis: Der Vergleich der aufgetragenen Impulszahl mit der Impulszahl des Eluats ergibt einen Verlust von etwa 1 %.

b) Hauptchromatogramm im System BUSH LT 21/85

Bei diesem Chromatogramm kommt es auf eine exakte Isolierung von Tetrahydrocorticosteron an. Dazu ist notwendig, ein System zu finden, bei dem Tetrahydrocorticosteron gut von den übrigen Corticosteronmetaboliten abgetrennt wird und es selbst in einer scharf begrenzten Zone vorliegt; zusätzlich müssen die R_{S} -Werte von Tetrahydrocorticosteron (= Laufstrecke von Tetrahydrocorticosteron in cm/Laufstrecke von

Desoxycorticosteron in cm) bei einem größeren Kollektiv von Bestimmungen eng beieinander liegen. Die R_s -Werte geben einen guten Maßstab für die Brauchbarkeit eines Chromatographiesystems.

In einer Anzahl von Vorversuchen mit verschiedenen Chromatographiesystemen ergab sich im System LT 21/85 eine optimale Auftrennung des Urinextraktes. Die R_s -Werte von Tetrahydrocorticosteron betrugen in diesem System im Mittel 1,9. Die mittlere quadratische Abweichung war mit $\pm 0,1$ gering.

Der Verlust im System LT 21/85 beträgt wie im System BUSH B 5 etwa 1 %.

4. Farbreaktion

Die Genauigkeit und Empfindlichkeit der gesamten Methode hängen außer von der Messung der Radioaktivität von Tetrahydrocorticosteron vor allem von der quantitativen Bestimmung dieses Steroids ab.

Der Urinmetabolit Tetrahydrocorticosteron muß möglichst rein dargestellt werden, da die Farbreaktion mit Tetrazolsalz nicht spezifisch ist. Es ist bekannt, daß alle Corticosteroide mit einer α -Ketol-(Ketoalkohol)-Seitenkette Tetrazolsalze reduzieren (33) und selbst Eluate von vorgewaschenem Chromatographiepapier mit Tetrazolblau reagieren. Alle Methoden, die entweder auf einer Direktmessung des

mit Tetrazolblau angefärbten Chromatogramms oder einer Elution der bereits gefärbten Hormonzone beruhen, sind deshalb mit sehr hohen Papierleerwerten belastet (34). So lag bei Vorversuchen, die zur Testung der Elution von tetrazolgefärbten Tetrahydrocorticosteronzonen bekannter Hormonmengen durchgeführt wurden, die untere Nachweisgrenze zwischen 4 μg und 8 μg ; in Parallelversuchen schwankte diese Nachweisgrenze sehr stark. Die Aufstellung einer Eichkurve mit Tetrahydrocorticosteron-Reinsubstanz war uns bei dieser Versuchsanordnung nicht möglich.

BUSH (34) gab eine Methode an, bei der durch Bleichen der mit Tetrazolblau gefärbten Chromatogramme in einer mit SO_2 -Gas gesättigten Kammer eine Verminderung der Papierleerwerte erzielt werden sollte. Auch mit dieser Methode konnten wir keine Eichkurve mit Tetrahydrocorticosteron aufstellen.

Erst durch Reinigung des Eluats von Tetrahydrocorticosteron an einer Silicagelsäule und Farbreaktion mit Tetrazolblau im Reagenzglas konnte eine Eichkurve, die dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz bis 15 μg folgte, aufgestellt werden.

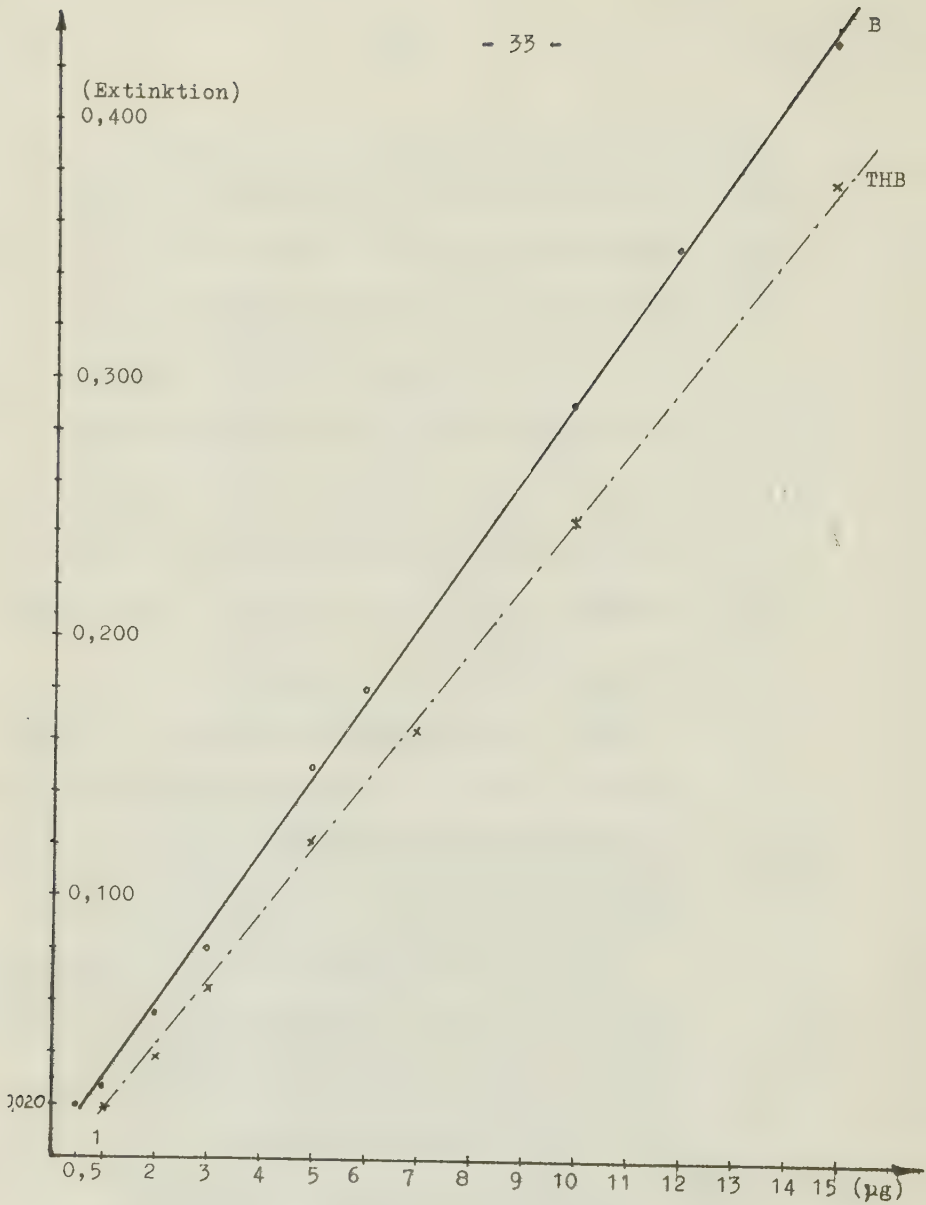


Abbildung 7: Eichkurve für B und THB
B = Corticosteron
THB = Tetrahydrocorticosteron

5. Messung der Radioaktivität von Tetrahydro- corticosteron

Bei der Radioaktivitätsmessung kann die physikalische Halbwertszeit des ^{14}C -Kohlenstoffs unberücksichtigt bleiben, da sie 2.500 Jahre beträgt (35). Auch von einer Berechnung der Zählverluste wegen Überschreitung der Auflösungszeit des Gerätes durfte abgesehen werden, da bei unseren Versuchen nur mit niederen Impulsraten gearbeitet wurde. Eine wesentliche Rolle für die Verwertbarkeit der Zählergebnisse spielt der Nulleffekt. Erst nach Abzug dieses Leerwertes von der gezählten Impulszahl kann die wahre Impulsrate (I_w) ermittelt werden. Je näher die wahre Impulsrate beim Leerwert liegt, desto länger muß die Meßzeit des Leerwertes und der Gesamtimpulszahl sein.

Die Genauigkeit der Messung ist von der Statistik der Zählung abhängig. Allgemein kann gesagt werden: Die statistische Genauigkeit ist um so größer, je höher die Zahl der gezählten Impulse ist (36).

Der absolute statistische Fehler ΔI_w steht mit N
(= gemessene Impulszahl) in folgendem Zusammenhang:

$$I_w = \sqrt{\frac{N}{t^2} + \frac{N_o}{t_o^2}}$$

$$= \sqrt{\frac{I_g}{t} + \frac{I_o}{t_o}}$$

I_g = Impulsgesamtrate (Imp./Min.)

I_o = Nulleffekt (Imp./Min.)

t = Meßzeit der Gesamtempulsrate

t_o = Meßzeit der Nulleffektmessung

N_o = Gesamtempulszahl der Nulleffektmessung

Der relative prozentuale Fehler ist:

$$\delta I_w = \frac{\Delta I_w}{I_w} \cdot 100 (\%)$$

I_w = wahre Impulsrate = $I_g - I_o$

Beispiel: Es werden die Werte einer Messung der Urin-
gesamttaktivität verwendet (Urin A. D.).

$I_o = 24,1$ (Imp./Min.)

$t_o = 40$ Minuten

$I_g = 42,5$ (Imp./Min.)

$t = 40$ Minuten

In die Formel eingesetzt ergibt sich:

$$\Delta I_w = \sqrt{\frac{42,5}{40} + \frac{24,1}{40}}; \quad \delta I_w = \frac{\Delta I_w}{I_w} \cdot 100$$

$$= \pm 1,2 \quad = \frac{1,2}{18,4} \cdot 100$$

$$= 6,5 \%$$

Der absolute statistische Fehler dieser Bestimmung
beträgt also: $\pm 1,2$; der relative prozentuale
Fehler 6,5 %.

Bei einer Meßdauer von 10 Minuten für t und t_0 wäre der absolute statistische Fehler etwa doppelt so groß, nämlich 2,6; die relative prozentuale Abweichung wäre 14 %.

Der Gesamtverlust der Methode beträgt im Mittel 25 %. Hierbei sei nochmals darauf hingewiesen, daß unsere Methode von diesem Verlust unabhängig ist, da die Sekretionsrate von Corticosteron nicht aus der im Urin ausgeschiedenen Tetrahydrocorticosteronmenge, sondern aus der spezifischen Aktivität dieses Metaboliten bestimmt wird.

(Die spezifische Aktivität von Tetrahydrocorticosteron = Urinausscheidung von Tetrahydrocorticosteron (mg/Tag) : pro Tag ausgeschiedene Aktivität von Tetrahydrocorticosteron (Imp./Min.))

Da erst nach Elution von Tetrahydrocorticosteron vom zweiten Chromatogramm der zur Radioaktivitätsmessung bestimmte Teil des Eluats von dem zur quantitativen Bestimmung vorgesehene Teil des Eluats abgetrennt wird, ist bei unserer Methode der Verlust von ^{14}C -Tetrahydrocorticosteron und Tetrahydrocorticosteron bis zur Endpunktbestimmung gleich. Die spezifische Aktivität von

Tetrahydrocorticosteron wird durch den Verlust bei der Isolierung dieses Steroids deshalb nicht beeinflusst.

Die Genauigkeit der Sekretionsratenbestimmung wurde durch eine Vierfachbestimmung bei einer Normalperson geprüft. Die Standardabweichung (s) betrug dabei 0,2. Die Einzelwerte wichen um $\pm 5\%$ vom Mittelwert ab. Nach TAMM (37) soll die Standardabweichung nicht mehr als 10 % vom Mittelwert abweichen. Die Präzision unserer Methode ist also trotz ihrer relativ vielen methodischen Einzelschritte ausreichend.

Die Arbeitszeit, die für die Bestimmung von gleichzeitig zwei Sekretionsraten aufgewendet werden muß, beträgt ungefähr 48 Stunden.

C) Ergebnisse von Bestimmungen der Sekretionsrate von

Corticosteron bei Normalpersonen

In der Tabelle sind die Ergebnisse der Untersuchungen bei 11 Normalpersonen zusammengestellt. Es wurden 9 Frauen und 2 Männer im Alter von 17 - 40 Jahren untersucht.

T a b e l l e

Nr.	Name	Alter	Ge- schlecht	Tetra- hydro- corti- coste- ron im Urin mg/Tag	Sekre- tions- rate v. Corti- coste- ron mg/Tag	Aktivi- tät von THB in % der inji- zierten Dosis
1	H.H.	21	w	0,12	3,0	7,8
2	B.E.	35	w	0,31	3,8	8,2
3	T.E.	22	w	0,07	2,9	2,5
4	M.E.	40	w	0,33	3,1	10,6
5	H.E.	27	m	0,09	3,1	3,0
6	B.A.	26	w	0,14	2,5	5,6
7	P.J.	28	w	0,24	3,7	5,6
8	M.R.	29	w	0,08	4,0	2,1
9	F.W.	27	m	0,14	2,6	5,4
10	A.J.	17	w	0,23	3,9	5,8
11	S.C.	18	w	0,17	3,1	5,4
Mittelwerte				0,175	3,25	5,6
Standardabweichung (s)				0,09	0,5	

Die Gesamtaktivität der 24-Stunden-Urinmenge betrug im Durchschnitt bei unseren Versuchen 72 % der verabreichten Impulszahl. PETERSON (19) fand im Durchschnitt 73 % und VAN DER STRAETEN (21) 66 % der verabreichten Dosis.

Als Tetrahydrocorticosteron wurde im Durchschnitt 5,6 % der injizierten Dosis wiedergefunden. Dies sind im Mittel 20 % der im β -Glucuronidaseextrakt vorhandenen Aktivität. Im Mittel schieden die Versuchspersonen 0,175 mg Tetrahydrocorticosteron pro Tag aus (0,07 - 0,33 mg pro Tag); die Standardabweichung war dabei $s = 0,09$.

Die Sekretionsrate von Corticosteron betrug im Durchschnitt 3,25 mg pro Tag (von 2,6 - 4,0 mg); die Standardabweichung war $s = 0,5$.

Wir haben diese Ergebnisse mit denen anderer Autoren, die die Corticosteronsekretionsrate ebenfalls mit der Isotopenverdünnungstechnik bei Normalpersonen bestimmt haben, verglichen und fanden:

Die Mittelwerte liegen bei allen Autoren in der gleichen Größenordnung. Die Schwankungsbreite der Werte ist allerdings unterschiedlich. Die untere Grenze des Normalbereiches unserer Werte ($x - 2s = 2,2$ mg/Tag) liegt um 1,0-1,7 mg

höher als die der anderen Autoren. (PETERSON (19), BIGLIERI (38), VAN DER STRAETEN (21). Die obere Grenze des Normalbereiches ($\bar{x} + 2s = 4,2$ mg/Tag) stimmt dagegen mit den Werten von PETERSON (19) (4,1 mg) und BIGLIERI (38) (4,5 mg) gut überein.

ZUSAMMENFASSUNG

Im literarischen Teil der Arbeit wurden die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchungen über die Sekretion und die biologische Wirkung von Corticosteron dargestellt.

Im experimentellen Teil wurde zuerst die Methode zur Bestimmung der Corticosteronsekretionsrate beim Menschen genau beschrieben, nach der mit Hilfe der Isotopenverdünnungstechnik und der quantitativen Bestimmung des Corticosteronmetaboliten Tetrahydrocorticosteron aus dem Urin die Sekretionsrate von Corticosteron berechnet werden kann.

In den Untersuchungen und der Diskussion zur Methode wurden zu Beginn die theoretischen Voraussetzungen für die Bestimmung der Sekretionsrate von Corticosteron erörtert.

Bei der Besprechung und experimentellen Prüfung der methodischen Einzelschritte wurden folgende Teile der Methode durch eigene Untersuchungen geprüft und die Ergebnisse dieser Untersuchungen diskutiert:

Nach Spaltung der im Urin ausgeschiedenen Glucuronsäureester mit β -Glucuronidase konnten im Durchschnitt 28 % des injizierten ^{14}C -Corticosteron erfaßt werden.

Bei der Prüfung des Einflusses von Bebrütungszeit und Temperatur auf die Esterspaltung erwies sich eine Bebrütungszeit von 48 Stunden und eine Bebrütungstemperatur von 47°C als optimal.

Der Verlust, der bei Extraktion, Reinigung, Petrolätherverteilung und Chromatographie des Extraktes auftrat, betrug insgesamt 9 %.

Da die Genauigkeit und Empfindlichkeit der gesamten Methode außer von der Messung der Radioaktivität vor allem von der quantitativen Bestimmung des Urinmetaboliten Tetrahydrocorticosteron abhängig ist, wurden verschiedene in der Literatur angegebenen Methoden zur quantitativen Bestimmung von Steroidhormonen geprüft.

Die Reaktion von Tetrazolblau mit Tetrahydrocorticosteron ist keine spezifische Reaktion. Deshalb gelang erst nach Reinigung von Tetrahydrocorticosteron an einer Silicagelsäule und Farbreaktion mit Tetrazolblau im Reagenzglas eine ausreichend genaue Bestimmung des Corticosteronmetaboliten. Eine mit Tetrahydrocorticosteron aufgestellte Eichkurve folgte bis 15 µg dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz.

Die statistischen Voraussetzungen, die bei der Zählung der radioaktiven Impulse gegeben sein müssen, wurden

diskutiert und an Beispielen aus unseren Messungen belegt.

Der Gesamtverlust der Methode betrug im Mittel 25 %. Da die Sekretionsrate von Tetrahydrocorticosteron nicht aus der im Urin ausgeschiedenen Tetrahydrocorticosteronmenge, sondern aus der spezifischen Aktivität von Tetrahydrocorticosteron (= Urinausscheidung von THB mg/pro Tag : pro Tag ausgeschiedene Aktivität von THB Imp./Min.) bestimmt wird, war unsere Methode vom Verlust unabhängig. Außerdem war der Verlust des zur Radioaktivitätsmessung bestimmten Teils des Eluats und der zur quantitativen Bestimmung abgetrennte Teil des Eluats bis zur Endpunktbestimmung gleich. Die Genauigkeit der Methode war bei einer Vierfachbestimmung relativ hoch. Die Einzelwerte wichen nur um ± 5 % vom Mittelwert ab.

Bei der Bestimmung der Sekretionsrate von Corticosteron an 11 Normalpersonen (9 Frauen, 2 Männer) wurden folgende Versuchsergebnisse festgestellt:

Im Mittel schieden sie 0,175 mg THB pro Tag aus (von 0,07 - 0,33 mg pro Tag). Standardabweichung (s) = 0,09.

Die Sekretionsrate von Corticosteron betrug im Durchschnitt 3,25 mg pro Tag (von 2,6 - 4,0 mg). Standardabweichung war s = 0,5.

Auf Grund der großen Genauigkeit unserer Methode kann erwartet werden, daß durch die Bestimmung der Corticosteronsekretionsrate bei einer größeren Gruppe von gesunden und kranken Versuchspersonen gute Aufschlüsse über die Nebennierenrindensekretion von Corticosteron beim Menschen gewonnen werden können.

L I T E R A T U R

- (1) HANDBUCH DER EXPERIMENTELLEN PHARMAKOLOGIE
BAND XIV: The Adrenocortical Hormones,
Teil I, S. 201 - 206
- (2) ROMANOFF, E.B.,
HUDSON, P.,
PINCUS, G.: Isolation of hydrocortison and corticosteron from human adrenal vein blood
J. of cl. Endocr.
13, 1546 (1963)
- (3) AYRES, P.J.,
BARLOW, P.,
GARROD, O.,
TAIT, S.A.S.,
TAIT, J.F.,
WALKER, G.: Correlation of adrenal steroid concentration and changes in electrolyt metabolism.
Scand. J. cl. lab. Invest. Suppl.
31, 29 (1958)
- (4) KENDALL, E.L.,
MASON, W.M.,
HOEHM, B.F.,
KENZIE, M.C.: Chemical studies of the suprarenal cortex III
Structures of compounds A, B, H.
J. biol. Chem.
120, 719 (1937)
- (5) HECHTER, D.,
PINCUS, G.: Genesis of the adrenocortical secretion.
Physiol. Revue
34, 459 (1954)
- (6) BUSH, I.E.: Species differences in adrenocortical secretion.
J. Endocr.
9, 95 (1953)
- (7) SINGER, B.,
STACK-DUNNE, M.P.: The secretion of aldosterone and corticosteron by the rat adrenal.
J. Endocr.
12, 130 (1955)

- (8) REIF, A.E.,
LONGWELL, B.B.: Extraction of corti-
costeroids from adrenal
vein blood of rats and
rabbits.
Endocrinol.
62, 573 (1958)
- (9) FARREL, G.L.,
BANKS, R.C.,
KOLETSKY, S.: The secretion of corti-
costeron by the dogs
adrenal.
Endocrinolog.
58, 104 (1956)
- (10) BRITTON, S.W.: Adrenal insufficiency
and related considere-
tions.
Physiolog. Rew.
10, 617 (1930)
- (11) KUIZINGA, M.H.: The isolation and chemi-
stry of the adrenal hor-
mones.
Am. Ass. Advance Sci.
57, 68 (1944)
- (12) GROSS, F.: Nebennierenrinden-Was-
serstoffwechsel unter
besonderer Berücksichti-
gung von Aldosteron.
Kl. Wo.
34, 929 (1958)
- (13) THORN, G.W.: Carbohydrat metabolism
in Addison disease.
J. cl. Invest.
19, 813 (1940)
- (14) CONN, J.W.,
FAJANS, S.J.,
LOUIS, L.H.: Metabolic effects in man
of orally and parente-
rally administreted corti-
costeron.
Transact. of the Amer.
Physic.
64, 269 (1951)

- (15) THORN, G.W.,
JENKINS, D.: Pharmacological aspect of
adrenocortical steroids
and ACTH in man.
New. Eng. J. Med.
248, 232 (1953)
- (16) FERREBEE, J.W.: Comparison of certain
effects of DOC-acetat,
corticosteron-cortical
extract on patients with
Addison's disease.
Endocrinolog.
27, 766 (1941)
- (17) KARL, J.H.,
RAITH, L.,
FISCHER, W.: Die Sekretion von Corti-
costeron bei Fettsüchtigen
und bei Personen mit
Cushingsyndrom.
11. Symposium dtsch. Ges.
für Endokr. Berlin-
Göttingen-New York,
Springer (1964)
- (18) FLOOD, C.,
LAYNE, D.S.,
RAMSCHARAN, S.,
ROSSIPAL, E.: An investigation of
the urinary metabolites
and secretion rates of
aldosteron and cortisol
in man and a description
of methods for their
measurement.
Acta endocr. (Kbh.)
36, 237 (1961)
- (19) PETERSON, R.E.,
PIERCE, C.E.: The metabolism of corti-
costeron in man.
J. cl. Invest.
39, 741 (1960)
- (20) GRANT, I.K.,
FORREST, A.P.M.,
SYMINGTON, T.: The secretion of cortisol
and corticosteron by the
human adrenal cortex.
Acta endocr. (Kbh.)
26, 195 (1957)
- (21) VERMEULEN,
VAN DER STRAETEN, M.D.: Adrenal cortical function
in benign essential hyper-
tension.
Cl. Endocr. and Metabol.
23, 574 (1963)

- (22) COST, W.S.: Quantitativ estimation of adrenocortical hormones and their -ketolic metabolites in urine. Acta endocr. (Kbh.) 41, 571 (1962)
- (23) DOHAN, F.C.,
BULASCHENKO, H.
RICHARDSON, E.M.: Urinary alphaketolic metabolites of corticosteron and cortisol related to bodysize of normal and hypertensive males. Clin. End. and Metab. 22, 916 (1962)
- (24) BETTE, L.,
BLAISE, H.,
LEPPELA, W.,
OERTEL, G.W.,
WEINHEIMER, B.: Direkte Katheterisierung der rechten und linken Nebennierenvene beim Menschen. Cli. Wo. 41 H 20, 1025 (1963)
- (25) PEARLMAN, W.H.: Circulating steroid hormone levels in relation to steroid hormone production. Ciba Found. Coll. on Endocr. 11, 233 (1957)
- (26) PETERSON, R.E.: The miscible pool and turnover rate of adrenocortical steroids in man. Rec Progr. in Horm. Resear 15, 231 (1959)
- (27) KARL, J.H.,
RAITH, L.: Corticosteronsekretion beim Menschen. Kli. Wo. 43, 863 (1965)
- (28) AXELROD, L.R.: The separation and identification of mixtures of C₂₁ and C₁₉ steroids by papierchromatography. J. biol. chem. 205, 173 (1953)

- (29) TAIT, J.F.: Review: The use of isotopic steroids for the measurement of production rates in vivo. J. clin. Endocr. 23, 1285 (1963)
- (30) LAUMAS, K.R.,
TAIT, J.F.,
TAIT, S.A.S.: The validity of the calculation of secretion rates from the specific activity of a urinary metabolite. Acta endocr. (Kbh.) 36, 265 (1961)
- (31) GLENN, E.M.,
NELSON, O.H.: Chemical method for the determination of 17-OH corticosteroids in urine following hydrolysis with β -glucuronidase. J. Endocr. 13, 911 (1953)
- (32) SEGAL, L.,
SEGAL, B.,
WILLIAM, R.: The acid catalyzed solvolysis of dehydroepiandrosteron sulfate and its significance in the examination of urinary 17-keto steroids. J. biol. Chem. 235, 3206 (1960)
- (33) SEEGER, E.: Quantitative Darstellung von Corticosteroiden aus Nebennieren und Urin. Naunyn-Schmiedebergs Archiv exp. Path. Pharmac. 242, 101 (1961)
- (34) BUSH, J.E.: The chromatographie of steroids. Pergamon press, 230 (1961)
- (35) BEIER und DÖRNER: Isotopenfibel VEB Georg Thieme, Leipzig (1957)

- (36) KOBLET: Physikalische Begriffe in
der klinischen Biochemie.
(1964)
- (37) TAMM, J.E.: Methodik, Fehlerquellen
und Deutung der Corti-
costeroidbestimmung im
Harn.
Internist (Berlin)
4, 559 (1963)
- (38) BIGLIERI, E.G.,
SATOSHI, H.,
SLATON, P.E.: In vivo and in vitro
studies of adrenal secre-
tion in Cushings syndrom
and primary Aldosteronism.
J. cl. Invest.
42, 516 (1963)

Herrn Professor Dr. H. Schwiegk danke ich,
daß ich an seiner Klinik und in seinem Labor
arbeiten durfte.

Besonders möchte ich Herrn Dozent Dr. med.
Karl für die Überlassung des Themas, sowie
für die Ratschläge und die Hilfe, die er mir
während meiner Arbeit zukommen ließ, danken.

LEBENSIAUF

Am 26. August 1937 wurde ich als Sohn des Berufsschuldirektors Josef Fischer und seiner Ehefrau Irma, geborene Schorpp, in Kaufbeuren geboren.

Nach 5 Klassen Volksschule trat ich in das humanistische Gymnasium Kaufbeuren ein. Im Juli 1959 erhielt ich das Reifezeugnis dieser Anstalt.

Im Wintersemester 1959/60 begann ich das medizinische Studium an der Ludwigs-Maximilians-Universität München und legte dort anschließend an das Wintersemester 1961/62 das Physikum und im Sommer 1965 das medizinische Staatsexamen ab.

